维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)02－0300－02

环丙沙星对体外培养的人结膜成纤维细胞增殖抑制作用的研究

方　静，张学东，雷春涛，李　琦，刘朝辉

(重庆医科大学临床学院眼科，重庆　400016)

【摘　要】目的：探讨环丙沙星对人结膜成纤维细胞增殖抑制作用的效果。方法：应用 MTT 法，观察不同浓度环丙沙星对人结膜成纤维细胞增殖的影响。结果：环丙沙星对人结膜成纤维细胞均有明显的抑制作用，其效果呈浓度依赖性。结论：环丙沙星对防治 PVR 有效，本研究为环丙沙星应用于临床提供了依据。

【关键词】增殖性玻璃体视网膜病变；药物防治；环丙沙星

【中国图书分类法分类号】R774.1　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2004－07－19

Inhibitory effect of ciprofloxacin on proliferation of cultured fibroblast in human conjunctiva

FANG Jing, et al

(*Department of Ophthalmology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To estimate the anti－proliferative effect of ciprofloxacin on the cultured human conjunctiva fibroblast. *Methods*: The cultured human conjunctiva fibroblasts were treated with different concentrations of ciprofloxacin. The inhibitory effect of ciprofloxacin was measured with MTT. *Results*: Ciprofloxacin induced a dose－dependent inhibition for growth of cultured human conjunctiva fibroblast. *Conclusion*: Ciprofloxacin can prevent the development of PVR effectively, which provides an evidence for the use of ciprofloxacin in clinic.

【Key words】Proliferative vitreoretinopathy; Pharmacotherapy; Ciprofloxacin

增殖性玻璃体视网膜病变(PVR)是眼组织对创伤修复的一种炎症反应和细胞过度增生的结果。其主要的病理特征是细胞增生，参与增生的细胞有视网膜色素上皮细胞(RPE)，成纤维细胞，神经胶质细胞等。有研究发现，环丙沙星有抑制细胞增殖的作用[2,13]，为了探讨环丙沙星在 PVR 防治中的价值，本文研究了这种药物对成纤维细胞增殖的影响。

1　实验部分

1.1　材料

1.1.1　实验仪器　全自动酶标仪(美国 Sigma 公司，MDF－381 型)、微量加样器(法国，Eppendprf)、微量震荡器(北京海定电子医疗仪器厂，WZ－2A 型)、96 孔培养板(丹麦 Delta 公司)、CO2 培养箱(美国 SHELLAB)、超净工作台(苏州净化设备公司，Speg Air Tech)、倒置显微镜(重庆光学仪器厂，XSZ－D2)、离心 机(北京医疗仪器维修厂，LHS－64－01)

1.1.2　实验试剂　环丙沙星(重庆制药七厂 0.2g/100ml)、噻唑蓝(MTT：美国 Sigma 公司)、二甲基亚砜(DMSO 苏州 I 工业园区正兴化工研究院分析纯)、DMEM 培养液(美国 Sigma 公司)、20％小牛血清(杭州四季青生物制品公司)、胰蛋白酶(美国 Difco 公司)。

1.2　方法

1.2.1　原代培养　原代人结膜成纤维细胞由急性眼外伤眼球摘除后获得。细胞培养参照司徒镇强[1]的方法。DMEM 培养液，内含 20％小牛血清及 10mg/L 庆大霉素。细胞在 5％CO_2、37℃ 培养箱中培养。第 3 天更换 1 次培养液，并观察细胞增殖状况及形态特征。

1.2.2　传代培养　在显微镜下观察发现成纤维细胞增殖至大部分汇合时，以 0.25％的胰蛋白酶作用细胞约 5～8min，再加入适量 DMEM 培养液终止消化，并用吸管轻轻吹打瓶壁使成纤维细胞悬起、分散，以血球计数板计数细胞，调节细胞密度为 1×10^5 个/ml，接种于培养瓶继续培养，每 3 或 4 天更换 1 次培养液。采用培养的第 3 代人结膜成纤维细胞进行药物的增殖抑制试验。

1.2.3　采用 MTT 法进行培养细胞的药物抑制试验。制备

作者介绍：方　静(1974－　)，男，硕士，
主要研究方向：玻璃体视网膜疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

培养的第 3 代人结膜成纤维细胞混悬液，调节细胞密度为 1×10^5/ml，接种于 96 孔培养板，每孔种植 200μl 细胞悬液。5%CO_2、37℃培养箱中培养 24h 后，吸去培养液，换上含 5 种不同浓度的环丙沙星的培养液，以不含任何药物的培养液为对照组。每个浓度及对照组均设 3 个平行孔，继续培养 48h 后吸去培养液，每孔加入不含小牛血清的 DMEM 培养液 100μl 及 MTT 溶液 10μl，轻轻混匀，5%CO_2、37℃培养箱中培养 4～6h 后弃去培养液，加入 DMSO 溶液 100μl，置震荡器上震荡 10～15min，在酶联免疫检测仪上测定培养板各孔的光密度 A 值，检测波长为 490nm。实验重复 3 次，计算各组细胞增殖抑制率：

细胞抑制率＝(1－用药组平均吸光度 A 值/对照组平均吸光度 A 值)×100%

1.2.4 统计方法 采用曲线拟合和直线回归方法。所有数据经 SPSS10.0 软件包统计。根据直线回归方程求出半数有效抑制量 IC_{50}。

2 结 果

环丙沙星对培养的人结膜成纤维细胞的抑制作用 实验结果表明，环丙沙星对人结膜成纤维细胞增殖有抑制作用，其抑制的程度呈浓度依赖性，抑制率与对数剂量呈直线相关，回归方程为：$Y=-8.505+52.885X$，IC_{50}值为 12.77μg/ml。倒置显微镜下观察：作用 30h 后，20μg/ml 以上浓度与对照组比较，细胞数量明显减少，细胞皱缩。40μg/ml 以上浓度细胞欠饱满，细胞间连接欠紧密，但未见细胞死亡或飘浮。5μg/ml 浓度范围作用下细胞形态同对照组无明显差别，镜下观察细胞密度差别不很明显。实验结果见表 1。

表 1 不同浓度环丙沙星对人结膜成纤维细胞增殖的抑制作用比较(48h)

药物浓度(μg/ml)	孔数	吸光值	抑制率(%)
80	3	0.067±0.002	89.2
40	3	0.147±0.003	77.3
20	3	0.215±0.004	65.4
10	3	0.356±0.003	42.7
5	3	0.455±0.003	26.9
对照	3	0.622±0.001	

3 讨 论

PVR 是指由于孔源性视网膜脱离、眼穿通伤或眼内手术造成血－视网膜屏障受损，视网膜色素上皮细胞(RPE)进入玻璃体，继而引起 RPE、神经胶质细胞、成纤维细胞等在玻璃体内增殖，形成以细胞为主的的纤维膜，后者的收缩，牵拉引起视网膜脱离，最终导致失明。其核心是细胞的增殖。PVR 的病理特征是细胞增生并形成有收缩能力的增生膜，该膜收缩引起牵拉性视网膜脱离。当前该病尚无满意的治疗方法。手术治疗有一定的疗效，但部分患者术后 PVR 复发。目前已发现多种药物能抑制 PVR 的增殖，主要是抗代谢药物，其中最有代表性的是 5－FU。但这一类药为细胞毒性药物，由于对视网膜的毒性，限制了其临床应用。因此寻找安全有效的药物防治 PVR 一直是眼科学家的追求。

环丙沙星是一种广泛应用于临床的喹诺酮类抗菌素，眼科用来作为手术后预防感染用药及治疗眼内感染。已有研究发现环丙沙星能抑制人淋巴细胞和正常造血干细胞的增殖。抑制剂量在不同文献报道不同[1,2]。ARNE 等[3]用流式细胞技术测定每个细胞中的 DNA 含量来评价处在细胞周期的 S 和 G_2/M 期的细胞占全部细胞比率，研究发现 20μg/ml 浓度的环丙沙星能使 50%以上体外培养植物凝集素刺激的淋巴细胞处于 S 和 G_2/M 期。ARNE 等还观察到在培养液中加入^{3}H 标记的胸腺嘧啶，低浓度的环丙沙星(＜5μg/ml)能使体外培养植物凝集素刺激的淋巴细胞中的胸腺嘧啶含量增加，而较高浓度的环丙沙星(80μg/ml)使淋巴细胞胸腺嘧啶的摄取量明显减少，这说明环丙沙星影响了嘧啶的生物合成途径。有报道较高浓度的环丙沙星在自由细胞系统中能抑制真核细胞 DNA 多聚酶 α 和 β 及脱氧核苷酸转移酶[4]。高浓度的环丙沙星减少了 DNA 合成的数量，并抑制 DNA 多聚酶 α 和拓扑异构酶Ⅰ和Ⅱ[5,6]。实验发现，环丙沙星对人结膜成纤维细胞有明显抑制作用。IC_{50}值为 12.77μl/ml，抑制作用呈剂量依赖性。其机理可能是通过抑制细胞中线粒体本身的拓扑异构酶的活性，阻碍细胞周期(尤其是在最需要能量的 S 期和 G_2/M 期)的进程，而抑制细胞增殖。另一个可能的机制推测是通过破坏 DNA 的修复或造成基因放大[3]。环丙沙星也可能通过影响胸腺嘧啶的从头合成途径[7]影响 DNA 合成，进而抑制细胞增殖。

综上所述，由于成纤维细胞在 PVR 的发生中的重要作用，增殖性玻璃体视网膜病变因为 RPE 细胞增殖成纤维化与结膜成纤维细胞相同，环丙沙星能有效抑制培养的人结膜成纤维细胞增(下转第 304 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

自体外周血干细胞移植术(AutoPBSCT)对多发性骨髓瘤、恶性淋巴瘤的疗效比较肯定,一般认为其疗效显著优于化疗。本文 2 例复发、难治多发性骨髓瘤经 AutoPBSCT 后获 CR,证实该方法对部分难治、复发病例可能有效。按文献报道,MM 患者经 AutoPBSCT 治疗缓解后最终易复发,本文对移植后 CR 患者口服反应停维持治疗,患者病情稳定,但须扩大病例并进一步观察。

目前认为外周血干细胞移植术较骨髓移植更快获得造血重建,但仍然存在较长的粒缺期和血小板减少期,患者仍有感染和出血的较大风险,尤其是老年或骨髓有一定损伤(如化疗、骨髓病变)的患者。使用造血刺激因子缩短血细胞减少或缺乏期只能获得有限的疗效。许多学者应用体外扩增的办法获得一定数量的自体干/祖细胞对患者进行支持治疗也有一定疗效,但这些方法通常费时而且获得的细胞通常是单一系列并且数量有限[2]。John F 等在异基因外周血自体干细胞移植中通过在 0,+3 天输注经 G-CSF 动员的外周单个核细胞可在短期内提升中性粒细胞,显著减少感染和血小板支持数量[1]。对 4 例血液肿瘤患者实施了两次外周血干细胞输注的 AutoPBSCT,结果提示可以减少粒细胞缺乏的时间,并显著减少感染、出血和对血液制品的依赖,大大降低了移植费用。两例 MM 患者前期化疗较多,年龄偏大,骨髓造血恢复较慢,但仍然无细菌感染和出血,提示两次外周血干细胞输注可能改善患者的一般状况。观察结果表明本方法主要在粒缺期前段时期短暂增加粒细胞数量或延迟粒细胞下降速度,而使用造血刺激因子主要可促进造血恢复,故推测两者合用可最大限度缩短粒缺期。

理论上多次输注自体外周血干细胞可能导致肿瘤复发增多,但实际应用中却有较大争议。有文献报道即便用纯化的自体 CD34+细胞作移植对防止 MM 复发并无改善,说明肿瘤复发主要原因不一定来自移植物。在有限的病例中没有发现复发增多的情况,但需进一步扩大病例观察。

参 考 文 献

[1] John F, DiPersio, Hanna Khoury, et al. Innovations in Allogeneic Stem-Cell Transplantation[J]. Seminars in Hematology, 2000;37(1):s233-41.

[2] Reichle A, Zaiss M, Rothe G, et al. Autologous tandem transplantation: almost complete reduction of neutropenic fever following the second transplantation by ex vivo expanded autologous myeloid postprogenitor cells[J]. Bone Marrow Transplantation, 2003;32:299-305.

[3] 张之南. 血液病诊断及疗效标准[M]. 科学出版社, 1998;342.

[4] 唐晓文, N Mormeau, N Milpied, et al. 选择性 CD34+细胞和非选择性自体外周血干细胞移植治疗多发性骨髓瘤的比较研究[J]. 中华血液学杂志, 2001;22:370-373.

(上接第 301 页)

殖,因而有可能抑制 PVR 的形成,但其临床运用需要进一步研究。

参 考 文 献

[1] 司徒镇强,吴军正,主编. 细胞培养[M]. 西安:世界图书出版公司,1996;68-79.

[2] Herold C, Ocker M, Ganslmayer M, et al. Ciprofioxacin induces apoptosis and inhibits proliferation of human colorectal carcinoma cells[J]. Br J Cancer, 2002;86(3):443-448.

[3] Holtom P, Pavkovic S, Bravos P, et al. Inhibitory effects of the quinolone antibiotics trovafioxacin, ciprofioxacin, and levofioxacin on osteoblastic cells in vitro[J]. J Orthop Res, 2000;18(5):721-727.

[4] Arne F, Stuart F. 4-Quinolone drugs affect cell cycle progression and function of human lymphocytes in vitro[J]. Antimicrobial Agents and Chemo-therapy, 1987;31(5):768-773.

[5] Wentzell L, Maxwell A. The complex of DNA gyrase and quinolone drugs on DNA forms a barrier to the T7 DNA polymerase replication complex[J]. J Mol Biol, 2000;304(5):779-791.

[6] Hussy P, Maass G. Effect of 4-quinolones and novobiocin on calf thymus DNA polymerase primase complex, topoisomerases Ⅰ and Ⅱ, and growth of mammalian lymphoblasts [J]. Antimicrob agents chemother, 1986;29(6):1073-1078.

[7] Rosen J, Schluter G, Williams G. Lack of effects of ciprofloxacin and the topoisomerase Ⅱ inhibitors, m-AMSA and nalidixic acid, on DNA repair in cultured rat liver cells[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1996;140(2):254-263.

[8] Arne F, Anders B. Effects of ciprofloxacin on eucaryotic pyrimidine nucleotide biosynthess and cell growth[J]. Antimicrob agents chemother, 1987;31(5):774-779.